Hämatologische Untersuchungen.

INAUGURAL-DISSERTATION

WELCHE

ZUR ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

IN DER

MEDICIN UND CHIRURGIE

MIT ZUSTIMMUNG

DER MEDICINISCHEN FACULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

am 4. August 1893

NEBST DEN ANGEFÜGTEN THESEN

ÖFFENTLICH VERTHEIDIGEN WIRD

DER VERFASSER

Leon Lilienfeld

aus Podhajce (Oesterreich).

OPPONENTEN:

Hr. Dr. med. Norbert Lilien.
- Albert Fleck, prakt. Arzt.
- Dr. phil. Albert Neumann.

BERLIN.

Buchdruckerei von Gustav Schade (Otto Francke).

Linienstrasse 158.

Seinen lieben Brüdern

gewidmet

vom

Verfasser.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535707_0174

I. Zur Chemie der Leukocyten.

Die Chemie der Leukocyten ist bis vor Kurzem blos an Material studirt worden, welches aus eiskaltem, filtrirtem Pferdeblutplasma nach Alexander Schmidt's Methode dargestellt worden ist. Abgesehen von der grossen Schwierigkeit in der Beschaffung derartigen Ausgangsmaterials, krankt diese Methode an dem ausserordentlich grossen Fehler, dass durch die Verdünnung des Plasmas mit dem 60 bis 80fachen Volumen Wassers der grösste Theil der in Wasser löslichen Substanzen, die, wie ich zeigen werde, die Hauptmasse der Leukocyten ausmachen, verloren geht.

Um über die eigentlichen primären gewebsbildenden Substanzen der Leukocyten zu einiger Orientirung zu gelangen, habe ich mir die Aufgabe gestellt, die Lymphocyten aus Lymphdrüsen und der Thymusdrüse in möglichst grosser Reinheit zu isoliren. Zu diesem Zwecke wurden die aus dem Schlachthause kommenden Drüsen von den Blutgefässen und dem anhängenden Fett sorgfältig befreit, in kleine Stücke geschnitten und in Colirtücher aus grobmaschigem, festem Hanf geschlagen; nachher wurden die ganzen Massen in einer Presse stark gepresst und der abfliessende Saft centrifugirt. Hierbei muss sorgfältig die Gegenwart von Wasser vermieden werden. Der Saft, welcher sich mikroskopisch als ein farbloses Serum mit darin suspendirten, vollständig gut

erhaltenen Lymphocyten darstellt, wird durch die Centrifuge in eine weisse Bodenschicht und eine darüber stehende trübe Flüssigkeit zerlegt. Die Flüssigkeit wird abgegossen und, nachdem das Mikroskop gelehrt, dass der Bodensatz nur aus Lymphocyten besteht, derselbe in Arbeit genommen.

Die Lymphocyten der Thymusdrüse des Kalbes sind meistens einkernige Zellen, in denen die Masse des Kerns diejenige des Cytoplasmas überragt. Unter dem Mikroskop sind sie ganz rund, gar nicht gequollen, bei Verarbeitung von frischen Drüsen ohne eine Spur von Zerfall.

a) Die Eiweisskörper des Cytoplasmas.

Im Wasserextract der Leukocyten lassen sich zwei Eiweisskörper nachweisen:

1) ein Eiweissstoff, der bei der Temperatur von 73 bis 75 Grad C. gerinnt,
2) ein bei 48 Grad coagulirender Eiweissstoff.

Ausserdem kann man aus dem Cytoplasma auch ein Nucleoproteid gewinnen, indem man die Leukocyten mit einer 10 proc. Kochsalzlösung extrahirt und das Kochsalzextract mit Wasser fällt[1]). Dieses Nucleoproteid ist in seinen Eigenschaften dem Ichthulin sehr ähnlich, es ist löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, unlöslich in Wasser. Löst man diese Substanz, frisch gefällt, in 0,1—0,3 proc. Salzsäure und unterwirft sie der Einwirkung künstlichen Magensaftes bei Körpertemperatur, so entsteht ein Niederschlag, welcher in verdünnten Säuren unlöslich, in caustischen und kohlensauren

---

[1]) Halliburton: Lehrbuch der chemischen Physiologie und Pathologie, Heidelberg 1893, S. 274.

Alkalien leicht löslich ist. Mit Soda und Salpeter verascht, giebt er reichliche Phosphorreaction. Darnach ist die Auffassung dieser Substanz als Nucleoproteid gerechtfertigt.

Nach Erschöpfung des ursprünglichen Nucleoproteids mit warmem Alkohol, kaltem, absolutem Alkohol und Aether wurde diese Substanz im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet, nachher bei 110 Grad zur Gewichtsconstanz gebracht und einer Analyse unterzogen.

Folgende Werthe resultirten:

C- und H-Bestimmung:

0,2371 gr Substanz gaben

0,4648 gr CO_2 = **53,45 %** C,
0,1632 gr H_2O = **7,64 %** H.

N-Bestimmung. (Nach Kjeldahl.)

0,2575 gr trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 28,60 cbm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **15,54 %** N.

P-Bestimmung.

3,2744 gr trockene Substanz gaben 0,0512 gr $Mg_2P_2O_7$ = **0,433 %** P.

b) Das Alkoholextract.

Kocht man die Leukocyten längere Zeit mit 96%igem Alkohol, so gehen ziemlich bedeutende Mengen von Bestandtheilen in Lösung über. Der Alkohol färbt sich braun. Filtrirt man nun ab und lässt das Filtrat eine Nacht lang in der Kälte stehen, so scheiden sich ziemlich grosse Mengen einer krystallinischen Substanz ab. Durch mehrfaches Umkrystallisiren aus warmem Alkohol gereinigt, erwies sich diese Substanz als Protagon. Wenn

man nämlich diese Substanz nach der Methode von Kossel und Freytag[2]) in Methylalkohol löst und die Lösung auf dem Wasserbade mit einer Lösung von Baryumhydrat in Methylalkohol versetzt, so bildet sich ein voluminöser Niederschlag. Derselbe wird mit barythaltigem Methylalkohol ausgewaschen, in Wasser fein zertheilt und mit einem Strom von Kohlensäure längere Zeit behandelt. Der nun entstehende Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und sodann bei 50 Grad mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus dem Alkohol krystallisiren nun bei Zimmertemperatur die für das Protagon charakteristischen Cerebroside aus. Sie stellen ein weisses, krystallinisches Pulver dar, welches mit verdünnter Schwefelsäure erhitzt eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung reducirende Zuckerart (Galactose) liefert. Ob hierbei ein oder mehrere Cerebroside entstehen, habe ich nicht näher untersucht. Da ich nun ausserdem eine Phosphorbestimmung in der ursprünglichen Substanz ausführte und die Zahl 1,13% fand, fühle ich mich berechtigt, diese Substanz mit Sicherheit als Protagon anzusprechen.

Der nach dem Abfiltriren des Protagons bleibende Alkohol wurde nun auf ein kleines Volumen abdestillirt und dann auf dem Wasserbade bis zur syrupösen Consistenz eingeengt, der Syrup in heisses Wasser gegossen; hierbei geht eine grosse Menge der Bestandtheile in Lösung. Wenn man nun die wässerige Lösung, nachdem sie von den schleimigen ungelösten Bestandtheilen abfiltrirt worden ist, eindunstet, so bekommt man schliesslich einen Syrup, der beim Erkalten zu einer festen

---

[2]) Arbeiten aus der Chemischen Abtheilung des Physiologischen Instituts zu Berlin, 3. Heft 1893, S. 440.

Krystallmasse erstarrt. Kocht man diese längere Zeit mit absolutem Alkohol aus, filtrirt ab und lässt den Alkohol erkalten, so krystallisirt aus demselben in schönen atlasglänzenden Blättchen eine Substanz aus, welche sich nach mehrfachem Umkrystallisiren aus 90%igem Alkohol als Amidovaleriansäure erwies.

Die Analyse ergab

1. 0,1817 gr Substanz gaben { 0,3454 gr CO_2 / 0,1583 gr H_2O

2. 0,1879 gr Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 15,1 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure.

Berechnet für die Formel: $C_5H_{11}NO_2$	Gefunden:
C = 51,28 %	C = 51,84 %
H = 9,401 %	H = 9,68 %
N = 11,96 %	N = 11,2 %

Der mit Alkohol erschöpfte Rückstand wird nun wieder in Wasser gelöst und mit basisch essigsaurem Blei gefällt. Der voluminöse Bleiniederschlag wird auf einem Filter gesammelt und mehrere Male mit Wasser ausgewaschen, nachher in Wasser fein vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelblei abfiltrirte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht und mit heissem Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt. Nach längerem Stehen scheidet sich eine grosse Menge schön ausgebildeter Krystalle aus. Die Krystallmasse, durch mehrfaches Umkrystallisiren aus wässerigem Alkohol gereinigt, schmilzt bei 225 Grad und erstarrt beim Erkalten zu feinen Nadeln. Die ausgeführte Elementaranalyse ergab Zahlen, welche die Identität des Körpers mit Inosit sicherstellten.

C- und H-Bestimmung.

0,2653 gr Substanz gaben { 0,3887 gr CO_2 = **39,96 % C**
0,1653 gr H_2O = **6,92 % H**

Berechnet für $C_6H_{12}O_6$:	Gefunden:
40,00 % C	39,96 % C
6,66 % H	6,92 % H.

Das auf diese Weise erhaltene Inosit ist krystallwasserfrei und giebt die Scherer'sche und Seidel'sche Reaction.

Ausser Protagon und Inosit gelang es mir, auch noch im Alkoholextract der Leukocyten Monokaliumphosphat nachzuweisen, worauf ich in einer anderen Abhandlung zurückzukommen gedenke.

Dass in dem Alkoholextract auch Lecithin und Cholesterin vorhanden sind, ergiebt sich aus der später folgenden quantitativen Analyse der Leukocyten.

c) Der Zellkern der Leukocyten und das Nucleohiston.

Schüttelt man die Leukocyten oder die ganzen fein zerhackten Thymusdrüsen mit Wasser, so geht ein Körper in Lösung, welcher die Hauptmasse des Leukocytenkernes ausmacht. Es ist dies das schon früher von mir[3]) beschriebene Nucleohiston; dasselbe wird folgendermaassen dargestellt. Das Wasserextract der Leukocyten oder der ganzen Drüsen wird colirt und die Flüssigkeit centrifugirt. Von dem hierbei entstehenden kleinen

---

[3]) Leon Lilienfeld, Ueber Leukocyten und Blutgerinnung. Derselbe, Ueber den flüssigen Zustand des Blutes und die Blutgerinnung. Verhandlungen der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin vom 8. April und 22. Juli 1892.

Bodensatz wird die Flüssigkeit abgegossen und filtrirt. Aus dem nun resultirenden, von zelligen Elementen völlig freien Wasserextract wird das Nucleohiston mit Essigsäure ausgefällt, auf einem Filter gesammelt, mit Wasser fein zerrieben, durch Zusatz von ein wenig Natriumcarbonat bis zur ganz schwach alkalischen Reaction gelöst, filtrirt und durch Essigsäure wieder gefällt. Nochmals durch Lösen und Fällen in derselben Weise gereinigt, wird der Körper für die Elementaranalyse mit essigsäurehaltigem Wasser, Weingeist, kaltem, absolutem Alkohol behandelt, nachher mit heissem, absolutem Alkohol drei bis viermal am Rückflusskühler ausgekocht und schliesslich mit Aether vollends erschöpft. Die ganz weisse Masse wurde mit dem Spatel in kleine Stücke zerbröckelt und unter der Luftpumpe getrocknet. Nach Abdunsten des Aethers stellt das Nucleohiston ein schneeweisses, äusserst zartes Pulver dar, welches sich bei 110 bis 115 Grad leicht bis zur Gewichtsconstanz trocknen lässt.

Die Eigenschaften des Nucleohistons sind folgende. Es ist unlöslich in Benzol, Alkohol, Chloroform, Methylalkohol und Aether, unlöslich in Essigsäure, dagegen löslich in Eisessig, concentrirter Salz- und Salpetersäure. Es ist ferner löslich in Natroncarbonat, Natriumhydrat und frisch gefällt in Kochsalz und Magnesiumsulfat, besonders bei Gegenwart von etwas Essigsäure. Die Elementaranalyse des Nucleohistons ergab:

C- und H-Bestimmung:

Präparat 1.

0,2242 gr trockene Substanz gaben
0,3969 gr CO_2 = **48,28 % C**
0,1454 gr H_2O = **7,21 % H.**

Präparat 2.

a) 0,2012 gr trockene Substanz gaben
0,3549 gr CO_2 = **48,11 % C**
(die Wasserstoffbestimmung ist verunglückt).

b) 0,2468 gr trockene Substanz gaben
0,4360 gr CO_2 = **48,18 % C**
0,1532 gr H_2O = **6,89 % H.**

Präparat 3.

a) 0,2468 gr trockene Substanz gaben
0,4417 gr CO_2 = **48,77 % C**
0,1524 gr H_2O = **6,86 % H.**

b) 0,1938 gr trockene Substanz gaben
0,3449 gr CO_2 = **48,54 % C**
0,1195 gr H_2O = **6,85 % H.**

Präparat 4.

0,2239 gr trockene Substanz gaben
0,4021 gr CO_2 = **48,98 % C**
0,1450 gr H_2O = **7,19 % H.**

N-Bestimmungen:

Präparat 1.

a) Nach Dumas: 0,2647 gr trockene Substanz gaben bei Bar. 740 mm, t. 17,9°, Vol. = 40 cbcm = **16,99 % N.**

b) Nach Kjeldahl: 0,2357 gr trockene Substanz wurden mit conc. Schwefelsäure und Permanganat verascht. Zur Neutralisation des alkalischen Destillats wurden verbraucht 28,23 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,77 % N.**

c) Nach Kjeldahl: 0,2525 gr trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 30,45 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,88 % N.**

Präparat 2. Nach Kjeldahl.

a) 0,3355 gr trockene Substanz verbrauchten 40,6 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,94 % N.**

b) 0,2596 gr trockene Substanz verbrauchten 31,18 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,82 % N.**

c) 0,2763 gr trockene Substanz verbrauchten 33,2 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,82 % N.**

Präparat 3.

0,3005 gr trockene Substanz verbrauchten 36,15 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,84 % N.**

Präparat 4. Nach Kjeldahl.

a) 0,3213 gr trockene Substanz verbrauchten 38,9 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,95 % N.**

b) 0,2761 gr trockene Substanz verbrauchten 33,1 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **16,78 % N.**

Die Veraschung grösserer Substanzmengen zum Zwecke der Bestimmungen von Schwefel und Phosphor wurde in der Weise ausgeführt, dass die Substanz mit Soda und Salpeter vollständig verbrannt wurde.

P-Bestimmungen.

Präparat 1.

a) 0,4165 gr trockene Substanz gaben 0,0465 gr Magnesiumpyrophosphat = **3,02 % P.**

b) 0,5245 gr trockene Substanz gaben 0,0580 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **3,088 % P.**

Präparat 2.

a) 0,3765 gr trockene Substanz gaben 0,0407 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **3,02 % P.**

b) 0,4845 gr trockene Substanz gaben 0,0516 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **2,974 % P.**

Präparat 3.

a) 0,4846 gr trockene Substanz gaben 0,0521 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **3,00 % P.**

b) 0,4983 gr trockene Substanz gaben 0,0548 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **3,071 % P.**

Präparat 4.

0,6132 gr trockene Substanz gaben 0,0659 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **3,00 % P.**

S-Bestimmungen.

Präparat 1.

0,2713 gr trockene Substanz, mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser gelöst, mit Salzsäure bis zur sauren Reaction versetzt und mit überschüssiger Salzsäure dreimal zur Trockne verdunstet, 14,4 mgr Baryumsulfat = **0,752 % Schwefel.**

Präparat 2.

0,3963 gr trockene Substanz gaben 0,0188 gr $Ba SO_4$ = **0,653 % Schwefel.**

Im Mittel resultiren die Zahlen:

C = 48,46 %
H = 7,00 %
N = 16,88 %
P = 3,025 %
S = 0,701 %.

Diese ausserordentlich gut übereinstimmenden Elementaranalysenzahlen einerseits und andererseits der Umstand, dass das erste Präparat, trotzdem es durch Lösen in Natroncarbonat und nachheriges Fällen nicht gereinigt wurde, in seiner Elementarzusammensetzung gut mit den

anderen übereinstimmt, liefern den werthvollsten Beweis, dass das Nucleohiston ein chemisches Individuum ist.

Nach seinem Phosphorgehalt und seinen Löslichkeitsverhältnissen differirt das Nucleohiston sowohl von den bisher bekannten Nucleoalbuminen als von den Nucleinen, um so mehr als es als Spaltungsproduct ein typisches Nuclein liefert.

Behandelt man das Nucleohiston längere Zeit mit künstlichem Magensaft bei Körpertemperatur, so liefert es als Endproduct ein Nuclein, während Eiweisskörper als Peptone in Lösung gehen.

In diesem Nuclein wurde, nachdem es mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen wurde, der Phosphorgehalt bestimmt.

Präparat 1.

0,2510 gr trockene Substanz, mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser gelöst und mit HCl mehrere Male eingedunstet, dann mit Magnesiamixtur versetzt, gaben 0,0446 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **4,988 % P.**

Präparat 2.

0,2829 gr trockene Substanz, gaben mit rauchender Salpetersäure nach Carius 5 Stunden auf 210 Grad erwärmt und nach dem Verdunsten der Salpetersäure in Wasser gelöst und mit Magnesiamixtur gefällt, 0,0506 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **4,995 % P.**

Im Mittel **4,991 % P.**

Ein Nuclein mit demselben Phosphorgehalt bekommt man aus dem Nucleohiston durch Behandeln desselben mit 0,8 %iger Salzsäure. Dann geht die eine Componente, das Histon, in Lösung, während das Nuclein ungelöst bleibt. Dieses Nuclein unterscheidet sich jedoch

von dem mit der Verdauungsmethode erhaltenen durch seine Löslichkeit in überschüssiger Salzsäure.

Ein durch Salzsäure von Histon vollständig befreites Präparat wurde auf seinen Phosphorgehalt geprüft, es gaben 0,5268 gr trockene Substanz 0,0887 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **4,702 % P.**

Daraus ergiebt sich, dass das durch die Verdauung und das durch Salzsäure erhaltene Nuclein identische Präparate sind.

Ich will hier gleich bemerken, dass man aus dem Nucleohiston durch Behandlung desselben mit siedendem Wasser noch ein Nuclein bekommen kann, welches sowohl in Wasser als in wässerigem Alkohol und sogar in verdünnten Mineralsäuren leicht löslich ist. Auf dieses Nuclein will ich ein ander Mal zurückkommen.

Aus dem Nucleohiston lässt sich auch Nucleinsäure abspalten; aus einer grösseren Menge wurde nach einer mir von Herrn Professor Kossel gütigst zur Verfügung gestellten, demnächst zu publicirenden Methode eine grössere Menge Nucleinsäure dargestellt und zur Synopsis der Phosphorgehalt darin bestimmt.

0,4684 gr trockene Substanz gaben 0,1617 gr $Mg_2 P_2 O_7$ = **9,64 % P.**

Was ist nun neben dem Nuclein das zweite Spaltungsproduct des Nucleohistons?

Behandelt man das Nucleohiston mit verdünnter Salzsäure, so geht ein Körper in Lösung, welcher mit dem von Kossel[4]) in den Kernen der rothen Blutkörperchen der Gans entdeckten Histon identisch ist. Die für das Histon charakteristische Eigenschaft ist die Fällbarkeit mit Ammoniak in salzsaurer Lösung und Unlös-

[4]) Zeitschrift für Physiologische Chemie 1884.

lichkeit in überschüssigem Ammoniak. Der aus dem Nucleohiston der Leukocyten gewonnene Körper zeigt alle von Kossel beschriebenen Eigenschaften. Mit Natronlauge und Kupfersulfat giebt er in der Kälte starke Biuretreaction. Die neutrale Lösung des Histons wird gefällt durch Ammonsulfat, Chlorammonium, Magnesiumsulfat, Natroncarbonat, Ammoniak, Kalkwasser, Aetznatron. Durch Natriumphosphat, neutrales und basisches Bleiacetat, Essigsäure, Schwefelsäure, Calciumchlorid, Quecksilberchlorid ist die Lösung nicht fällbar. Zur Synopsis des Körpers wurde der Ammoniakniederschlag des Histons analysirt. Es ergaben sich folgende Zahlen:

Lilienfeld:	Kossel:
C 52,34 %	**C 52,31 %**
H 7,31 %	**H 7,20 %**

Das Nucleohiston giebt, mit Schwefelsäure längere Zeit erhitzt, als Spaltungsproduct die Nucleinbasen, und zwar Adenin und Hypoxanthin. Es wurde der Stickstoff bestimmt, welcher in Form dieser zwei Basen gebunden ist. Zu diesem Zweck wurden 7,42 gr wasserhaltiges Nucleohiston mit 200 cbcm Wasser und 6 cbcm conc. H_2SO_4 zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt; dann wurde die gleiche Menge H_2SO_4 hinzugesetzt. Da das Kochen am Rückflusskühler durch starkes Schäumen der Reactionsflüssigkeit gehindert wird, wurde letztere noch sechs Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Nachher wurde abfiltrirt und der Niederschlag mit heissem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht, so dass die Lösung 20 % Ammoniak enthielt, mit ammoniakalischer Silberlösung in der Wärme gefällt, darauf mit ammoniakhaltigem Wasser und mit heissem Wasser ausgewaschen und der Niederschlag bei

100 Grad getrocknet. Die Wägung desselben ergab 1,281 gr Silberverbindung der Basen.

N-Bestimmung.

0,2500 gr verbrauchten 31,12 cbcm $^1/_{10}$ N.-Oxalsäure = **17,42 % N.**

Ag-Bestimmung.

0,5407 gr gaben 0,3065 gr Ag Cl = **24,66 % Ag.**

Die Beziehungen dieser Körper zu einander lassen sich demnach durch folgendes Schema versinnlichen:

Nucleohiston

In Wasser löslich, zerfällt bei Säurezusatz in

Histon | **Leukonuclein** in Säuren löslich. Zerfällt bei der Behandlung der alkalisch-alkoholischen Lösung mit Säure in

Eiweiss | **Nucleinsäure,** zerfällt beim Erhitzen mit Mineralsäure in

Phosphorsäure | **Nucleinbasen** (Adenin und Hypoxanthin).

Das Histon ist ein Eiweisskörper, welcher ausgesprochene basische Eigenschaften hat, was daraus erhellt, dass er mit Salzsäure eine in Wasser leicht lösliche Verbindung eingeht. Das Histon der Leukocyten unterscheidet sich von dem der Vogelblutkörperchen darin, dass es in der Hitze coagulirbar ist; das in der Hitze

entstehende Gerinnsel löst sich aber zum Unterschied von allen anderen Eiweissstoffen sehr leicht in Mineralsäuren auf. Ich kann hier nicht die Thatsache übergehen, dass das Histon in der physiologischen Chemie sehr vernachlässigt wurde und dass man den Einwand erhob, es sei das Histon vielleicht ein Kunstproduct der Salzsäure. Dieser Einwand ist vollkommen ungerechtfertigt; denn erstens ist an Gewinnung von Substanzen aus dem thierischen Organismus ohne chemische Reagentien nicht zu denken und zweitens ist das Histon als Base an eine verhältnissmässig starke Säure, das Nuclein, gebunden. Man muss daher die Verbindung mit einer Säure angreifen, um das Histon überhaupt zu erhalten.

Das Nucleohiston als Ganzes könnte man vielleicht als saures Salz auffassen. Aus der Lösung in Natriumhydrat fällt nämlich durch Alkohol die Natriumverbindung des Nucleohistons, welche in Wasser leicht löslich ist. In der wässerigen Lösung der letzteren fällt durch Baryumchlorid die Barytverbindung. Das Nucleohiston giebt Millon'sche Reaction, Xanthoproteinreaction und schwache Biuretreaction nach längerem Stehen. Es zersetzt Wasserstoffsuperoxyd, welche Eigenschaft nach der Behandlung mit Alkohol und Aether verloren geht.

d) Die quantitative Zusammensetzung der Leukocyten.

Auf Aufforderung des Herrn Professor Kossel führte ich auch eine Analyse der aus der Thymusdrüse isolirten Leukocyten aus. Meines Wissens ist das die erste Analyse einer normalen thierischen Zelle. Das Nucleohiston wurde so bestimmt, dass ich die Leukocyten 24 Stunden mit Wasser digerirte, nachher filtrirte und

das Filtrat mit Essigsäure fällte. Der Niederschlag wurde gesammelt, mit kaltem und heissem Alkohol, schliesslich mit Aether gewaschen, bei 115 Grad bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und mitsammt dem gewogenen Filter gewogen. Das Histon wurde als Ammoniakniederschlag, das Glykogen nach Brücke's Methode und die Nucleinbasen nach der früher erwähnten Methode bestimmt. Die anderen Substanzen bestimmte ich nach der in Hoppe-Seyler's Handbuch der Analyse angegebenen Methode.

Es ergaben sich im Mittel folgende Zahlen:

Trockensubstanz der Leukocyten im Durchschnitt:

11,49%.

Auf 100 Theile der Trockensubstanz berechnet, fand ich:

Gesammtphosphorgehalt	3,036
Gesammtstickstoffgehalt	15,05
Eiweissstoffe	1,76
Nucleohiston	68,78
Histon	8,67
Lecithin	7,51
Fette	4,02
Cholesterin	4,40
Glykogen	0,80
Silberverbindung der Nucleinbasen .	15,17

Geradezu frappant ist die ungeheure Menge von Nucleohiston und die verschwindend kleine Menge der Eiweisskörper. Ich muss noch bemerken, dass mehrere Analysen gut übereinstimmende Zahlen ergaben.

II. Zur Kenntniss der Blutgerinnung.

Dass die früher vollständig dunkle Frage der Blutgerinnung einigermaassen geklärt und auf chemische Principien zurückgeführt wurde, verdanken wir den wichtigen Entdeckungen Alexander Schmidt's. Seine Lehre lässt sich folgendermaassen kurz zusammenfassen: Im Blutplasma ist ein Stoff gelöst, das Prothrombin, welches durch die aus den Leukocyten stammenden, in Alkohol löslichen zymoplastischen Substanzen in ein Ferment, das Thrombin oder Fibrinferment übergeführt wird. Dieses Ferment führt nun das Fibrinogen in das Fibrin über. Das Fibrinferment ist ein Decompositionsproduct der Leukocyten und hier liegt der Schwerpunkt der Dorpater Anschauung. Der Schmidt'schen Theorie entgegengesetzt ist die Theorie von Wooldridge. Dieser Forscher spricht den Leukocyten jedwede Theilnahme am Blutgerinnungsprocesse ab. Das ganze Gerinnungssubstrat, welches aus 2 Fibrinogenen besteht, liefert das Blutplasma allein.

Eine Erweiterung wurde der Blutgerinnungsfrage durch die Untersuchungen Rauschenbach's[5]) zu Theil, welcher in der Faserstoffbildung einen allgemeinen cellulären Vorgang erkannte. Rauschenbach gelangt zu seinen Ergebnissen durch Versuche mit verschiedenen Zellen, deren wässeriges Extract im Salzplasma Gerinnung erzeugte, während die Zellen als solche vollkommen wirkungslos waren. Aus seinen Versuchen folgt unmittelbar, dass die Leukocyten und andere Cellulargebilde

[5]) Rauschenbach, Ueber die Wechselwirkungen von Protoplasma und Blutplasma. Mit einem Anhang betreffend die Blutplättchen von Bizzozero. Inaug.-Diss. Dorpat 1882.

den gerinnungseinleitenden Stoff im freien Zustande nicht enthalten, sondern eine Vorstufe desselben. Das kalt filtrirte Pferdeblutplasma besitzt die Fähigkeit, das Fibrinferment von den Zellen abzuspalten, während das Salzplasma als Reagens für freies Fibrinferment blos auf Zusatz von filtrirten wässerigen Zellenextracten gerinnt. Die wässerigen Extracte werden um so wirksamer, je länger das Wasser auf die Zellen eingewirkt hat.

Schon beim Studium der Rauschenbach'schen Arbeit fiel es mir auf, dass er die wirksamen Substanzen nur aus solchen Zellen isoliren konnte, welche sehr reich an Kernen waren. So erhielt Rauschenbach einen die Gerinnung erzeugenden Körper, indem er die rothen Blutkörperchen des Huhnes mit kohlensäurehaltigem Wasser behandelte und den hierbei ungelöst bleibenden Stoff sammelte. Er glaubte, Stromata der rothen Blutkörperchen vor sich zu haben; in der That aber hatte er fast nur die Kerne derselben in der Hand, welchen noch ein faseriges Gebilde anhängt. Von der Richtigkeit dieser Anschauung habe ich mich durch mehrere diesbezügliche Versuche überzeugt. Auch in allen anderen, von Rauschenbach als Gerinnungserreger benutzten Körpern hatte er immer sehr nucleinreiche Gebilde vor sich, und frappant schien mir schon die Thatsache, dass es unter allen, von ihm untersuchten Cellulargebilden kein einziges gab, welches in seiner coagulativen Wirkung den Spermatozoën gleichgekommen wäre. Die Spermatozoën übertreffen sogar die Leukocyten an Intensität des coagulativen Vermögens, indem sie in nicht vollen zwei Minuten im kaltfiltrirten Pferdeblutplasma die Gerinnung einleiten. Zieht man in Erwägung, dass die männlichen Sexualzellen die nucleinreichsten Gebilde im thierischen Organismus sind — nach Miescher z. B.

beträgt der Gehalt der Lachsspermatozoën an Nucleinsäure-Protamin mehr als 75% der Gesammtmenge der Spermatozoën —, so findet man noch einen Rückhalt für die Behauptung, dass mit dem Nucleinreichthum der protoplasmatischen Gebilde ihr coagulatives Vermögen wächst. Die Untersuchungen, über welche ich hier berichten will, sollen den Beweis liefern, dass der Zellkern der Leukocyten den Ausgangspunkt für die Faserstoffgerinnung bildet und dass das Nucleohiston das Substrat der Gerinnung darstellt.

Meine Arbeit zerfällt der Art der Beweise nach in zwei Theile:

a) Morphologisches.

Eine Reihe von Präparaten wurde von mir in folgender Weise angefertigt. Ich liess einen mit einem Deckgläschen aufgefangenen Blutstropfen durch verschiedene Zeiträume unter Verhütung der Verdunstung auf dem Objectträger gerinnen, wusch nachher das nun entstandene Faserstoffnetz mit einem Wassertrahle von den rothen Blutkörperchen vollständig frei, fixirte es längere Zeit mit Hermann'scher Lösung oder Osmiumsäure, tingirte, trocknete das Präparat an der Luft und schloss in Canada-Xylol ein. Als Tinctionsmethode dienten mir: Doppelfärbung mit Rhodamin und Methylgrün oder Saffranin und Gentianaviolett mit nachheriger Extraction von Gentiana in Orange. Bei Anwendung der ersten Färbungsmethode erscheinen die Kerne der Leukocyten und die Blutplättchen intensiv grün oder blau, das Cytoplasma und das Fibrinnetz dagegen rothviolett. Die auf diese Weise erhaltenen Bilder ergeben in erster Linie, dass sich die Fibrinfäden ausser, wie bekannt, an den Blutplättchen, an den Zellkernen der Leukocyten fest-

setzen. Man kann deutlich beobachten, wie die Fibrinfäden durch das Cytoplasma an den Kern heranreichen. Noch belehrender ist aber die Thatsache, dass gleich im Anfange der Gerinnung die Kerne in der Regel eine wandständige Lagerung einnehmen. Während der Gerinnung tritt auch folgende merkwürdige Erscheinung zu Tage:

Sehr viele von den mit den Fibrinfäden verknüpften Kernen der Leukocyten treten vermittels eines von dem Cytoplasma gebildeten schlauchartigen Fortsatzes aus dem Cytoplasma heraus. Ich möchte diesen Vorgang Karyoschise nennen. Man gewinnt den Eindruck, als ob die Faserstofffäden die Kerne gewaltsam an die Wand und aus dem Cytoplasma herausziehen. Im weiteren Verlauf der Gerinnung verschwindet das Cytoplasma vollständig und man bekommt schliesslich viele nackte Leukocytenkerne zu Gesichte. Diese Befunde gewinnen eine Bedeutung bei Heranziehung der bekannten biologischen Thatsache, nach welcher Zellkerne zur Zeit, wo sie an die Zellwand oder nach aussen Stoffe abgeben, aus der Mitte der Zelle nach der Wand hinwandern.

Da diese Versuchsanordnung nicht im Stande ist, über die Frage Aufschluss zu geben, ob die Zellkerne der Leukocyten während des Gerinnungsprocesses sich selbst in das Fibrin umwandeln, so wählte ich noch eine andere Versuchsanordnung, welche der in der Arbeit von Hlava[6]) benutzten ähnlich ist. Das Blut wird in Schalen aufgefangen und mit dünnen Fäden während 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 Secunden geschlagen. Die Fäden kommen nun in Osmiumsäure und werden dann

---

[6]) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 17. Band, S. 410.

gefärbt. Die successive angestellten Präparate ergeben nun, dass nach 15 Secunden sich an gefärbten Fäden eine granulirte Masse angesammelt hat, in welcher eine Menge freier Kerne liegen; nach 35 Secunden finden wir, dass sich die Kerne weniger gut tingiren und dass ihrer weniger im Präparate vorhanden sind. Nach 50 bis 55 Secunden ist die Mehrzahl der Kerne geschwunden. Nach 65 Secunden hat sich fertiges Fibrin gebildet, die Kerne sind ihrer ganzen Masse nach in Fibrin übergegangen.

Ich will vorweg bemerken, dass ich aus den mikroskopischen Beobachtungen selbst mir nicht erlaube, einen Schluss auf die Betheiligung der Zellkerne an der Faserstoffbildung zu ziehen. Ich stellte diese Versuche an, um auch durch directe mikroskopische Beobachtung die nunmehr folgenden chemischen Beweise zu erhärten.

b) Chemisches.

Im Allgemeinen umfasst die Lehre von der Blutgerinnung zwei Probleme: Das eine sucht die Bedingungen des Festwerdens eines Eiweisskörpers, des Fibrinogens, möglichst genau zu beschreiben; das andere, physiologisch von mindestens ebenso grosser Tragweite strebt, die räthselhafte Thatsache zu entziffern, dass das Blut innerhalb des lebenden Organismus flüssig bleibt.

Groth, ein Schüler Schmidt's[7]) war der Erste, welcher zeigte, dass Leukocyten, in's Blut injicirt, zwei Erscheinungen hervorrufen:

1) Das Blut gerinnt innerhalb der Gefässe,

---

[7]) Ueber die Schicksale der farblosen Elemente im kreisenden Blute. Inaug.-Diss. Dorpat 1884.

2) der Rest des Blutes wird gerinnungsunfähig. Es müssen also zwei Factoren in den Leukocyten vorhanden sein, von welchen einer die Fähigkeit besitzt, das Blut zum Gerinnen zu bringen, der andere das Blut seiner Gerinnungsfähigkeit zu berauben.

Es ist mir nun gelungen, diese Factoren aus den Leukocyten in reinem Zustande zu isoliren.

Beide Stoffe sind im Zellkern der Leukocyten enthalten, in welchem sie aneinander gebunden sind. Der Träger beider Stoffe ist das von mir isolirte Nucleohiston. Die eine Componente desselben, das Nuclein, ist der Träger der Gerinnung, die andere, das Histon, der Träger des flüssigen Zustandes des Blutes.

Experimentelle Beweise:

1) Nach der Injection des Nucleohistons in das kreisende Blut eines Hundes wird dasselbe im Blute in seine beiden Componenten gespalten. Es lässt sich nämlich im Harne der betreffenden Thiere das Histon durch alle für dasselbe charakteristischen Reactionen nachweisen. Da ich nun durch Injection des Histons, wie ich später zeigen werde, immer das ganze Blut des Thieres in einen permanent flüssigen Zustand versetzen kann, so folgt schon daraus, dass es die zweite Componente des Nucleohistons, das Nuclein sein muss, welche die intravasculären Thrombosen erzeugt.
2) Bringt man das Nucleohiston in eine für sich nicht gerinnende, nach Hammarsten's Methode bereitete, reine Fibrinogenlösung, welcher eine Spur von Kalksalzen beigemischt ist, so gerinnt dieselbe nach kurzer Zeit zu einem festen Kuchen.

Nachdem man dasselbe Resultat auch mit dem Spaltungsproduct des Nucleohistons, nämlich dem entsprechend zubereiteten Nuclein, erzielen kann, so ist letzteres der Träger der gerinnungserzeugenden Eigenschaften des Nucleohistons.

3) Führt man in den Kreislauf eines Hundes eine wässerige, neutrale Histonlösung ein, so bleibt das aus der Ader gelassene Blut permanent flüssig. Fängt man Blut in einer Histonlösung auf, so verliert es gleichfalls seine Gerinnungsfähigkeit. Fügt man zu Salzplasma eine Histonlösung hinzu und versetzt es dann mit einem Gerinnungserreger, mit welchem die Controllprobe bald gerinnt, also einer sogenannten Fibrinfermentlösung oder einer Nucleinlösung, oder einem Kalksalz, so bleibt es vollständig flüssig.

Als Beispiel führe ich folgenden Versuch an, aus der grossen Reihe der von mir ausgeführten entnommen.

Einem Hunde von 23 500 gr Körpergewicht, der durch eine subcutane Injection von 5 cbcm einer 2 %igen Lösung von Morphinchlorhydrat anästhetisch gemacht worden ist, wird auf der einen Seite die Vena jugularis, auf der anderen die Carotis freigelegt und in beiden in der bekannten Weise mit Gummischläuchen versehene Canülen eingebunden. Nachher werden in die Jugularis 8 gr Histon aus der Thymusdrüse, in 80 cbcm Wasser gelöst und mit Natriumcarbonat genau neutralisirt, injicirt. Die Injection dauert eine Minute. In demselben Momente, wo der Stempel der Spritze die Ausgangsöffnung erreicht, wird die an der Carotis sitzende Klemme geöffnet und das Blut aufgefangen. Das Thier stirbt durch Verblutung ganz ruhig und ohne Krämpfe.

Das gelassene Blut bleibt permanent flüssig bis zur eintretenden Fäulniss, wo die Beobachtung ausgesetzt wird. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Histonblutes tritt die merkwürdige Erscheinung zu Tage, dass die Leukocyten noch 24 Stunden nach dem Aderlass wohl erhalten sind und bei Zimmertemperatur lebhafte amöboide Bewegungen ausführen, dass ferner die Plättchen besser erhalten sind als durch irgend ein anderes Conservirungsmittel. Sie sind rund, vollkommen homogen und nicht im mindesten klebrig. Meines Wissens kann man solche Plättchen blos im circulirenden Blute sehen. Die rothen Blutkörperchen sind ebenfalls gut erhalten.

Das Histonblut liefert uns also in allen seinen Elementen das Bild des normalen lebenden Blutes. Wenn man in's Auge fasst, dass, wie ich nachgewiesen habe, das Histon ein normaler Bestandtheil der Leukocyten ist, so muss man das Histonblut als normales, lebendes Blut, das nach Abschleuderung der Formelemente erhaltene Histonplasma als normales Plasma betrachten. Was nun sein Verhalten gegen die Gerinnungserreger betrifft, so bietet es ebenfalls merkwürdige Eigenschaften. Es ist weder durch Verdünnung mit Wasser, noch Säurezusatz, noch Fibrinferment zur Gerinnung zu bringen. Nur Nuclein aus den Leukocyten ruft unweigerlich Gerinnung in dem Histonplasma hervor. Hierbei zeigte sich auch die merkwürdige Thatsache, dass auch gekochte Nucleinlösungen im Histonplasma Gerinnung erzeugten. Als Illustration diene folgende Versuchsreihe:

a) 3,5 cbcm Histonplasma werden mit 17,5 cbcm Wasser verdünnt. Das Gemisch trübt sich stark. Bald nachher entsteht ein flockiger, in verdünnter Essig-

säure löslicher Niederschlag; das Gemisch bleibt flüssig.

b) In 10 cbcm des Histonplasmas wird eine Stunde Kohlensäure eingeleitet. Trotzdem bleibt das Plasma permanent flüssig.

c) 10 cbcm werden mit verdünnter Essigsäure genau neutralisirt. Auch diese Portion zeigt absolut keine Gerinnungstendenz.

d) 15 cbcm Histonplasma werden mit 15 cbcm Salzplasma versetzt. Es erfolgt keine Gerinnung. Beweis, dass das Histonplasma kein Fibrinferment enthält.

e) 10 cbcm Histonplasma werden mit 20 cbcm einer auf Fibrinogenlösungen und Salzplasma ausserordentlich wirksamen, nach Schmidt's Methode bereiteten Fibrinfermentlösung versetzt; das Gemisch gerinnt absolut nicht.

f) 10 cbcm werden mit 10 cbcm einer neutralen Nucleinlösung aus Leukocyten versetzt. Nach 5 Minuten gerinnt die Flüssigkeit zu einem festen Kuchen, so dass man das Glas umkehren kann, ohne dass etwas herausfliesst.

Von der Wirkung der Peptone auf das kreisende Blut ist die Histonwirkung vollkommen verschieden. Dies erhellt daraus, dass

1) das Histon auch ausserhalb der Gefässe das Aderlassblut im permanent flüssigen Zustande erhält,

2) dass es auch Kaninchen injicirt das Blut ungerinnbar macht.

Letzteres möge folgender Versuch illustriren:

Einem Kaninchen von 2 kg Körpergewicht werden 0,6 gr Histon in 6 cbcm Wasser in die Vena jugularis

injicirt. Das nachher aus der Carotis gelassene Blut bleibt flüssig und ist nur durch Nuclein zur Gerinnung zu bringen.

Durch alle diese Versuche bin ich gezwungen, folgende 3 Thesen aufzustellen:

Der flüssige Zustand des Blutes ist eine Function des Zellkernes der Leukocyten und im Speciellen einer von denselben producirten Substanz, des Histons.

Die Gerinnung des Blutes ist ebenfalls eine Function des Zellkernes der Leukocyten und speciell einer in demselben enthaltenen Substanz, des Nucleins.

Beide Substanzen, sowohl die gerinnungshemmende als auch die gerinnungserregende, sind merkwürdiger Weise aneinander gebunden, u. z. als das Nucleohiston.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Kossel, meinen Dank für seine gütige Unterstützung auszusprechen.

Thesen.

I.

Es liegt kein Grund vor, den Blutplättchen einen activen Antheil an der Blutgerinnung abzusprechen.

II.

Die Chromatophilie der Sexualzellen beruht auf einer chemischen Verwandtschaft der Zellenbestandtheile zu basischen und sauren Farbstoffen.

III.

Die Nucleinbasen sind der Nucleinsäure nicht beigemengt, sondern in dem Atomcomplexe derselben enthalten.

Lebenslauf.

Verfasser, Leon Lilienfeld, mosaischer Religion, am 15. September 1869 zu Podhajce in Oesterreich als Sohn des Gutsbesitzers J. Lilienfeld geboren, erhielt seine Vorbildung auf dem k. k. Franz Josephs-Gymnasium zu Lemberg. Im Jahre 1887 bestand er daselbst das Abiturientenexamen und bezog die medicinische Facultät in Krakau. Ein Jahr nachher bezog er die Universität in Wien, deren medicinischer Facultät er als ordentlicher Hörer durch sechs Semester angehörte, wo er die Vorprüfungen und das praktische I. Rigorosum in Anatomie und Physiologie bestand. Seit dem Sommersemester des Jahres 1891 arbeitet der Verfasser als Hörer der medicinischen Facultät in Berlin am physiologischen Institut, von wo aus er mehrere Abhandlungen zur Chemie des Blutes und der Zelle publicirte. Am 28. Juli 1893 bestand er an der Königl. Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin das Examen rigorosum.

Während seiner Studienzeit besuchte er die Vorlesungen, Kliniken und Curse folgender Herren:

In Krakau: Czyrniański, Nowicki, Teichmann, Wróblewski.

In Wien: Albert, Billroth, v. Brücke, Frh. v. Eiselsberg, v. Kerner, Ludwig, Moser, Nothnagel, Schüssler, Stern, Stricker, Toldt, Vogl, Zuckerkandl.

In Berlin: Kossel.

Allen diesen Herren spricht Verfasser seinen Dank aus.